

BUNDESPRÄSIDENT DEUTSCHLAND

27 OKT 2003

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



EPO3/11251

REC'D 21 NOV 2003
WIPO PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 47 781.7

Anmeldetag: 14. Oktober 2002

Anmelder/Inhaber: FLUORON GmbH, Neu-Ulm/DE

Bezeichnung: Herstellung eines Färbemittels zur Visualisierung
von Zellen im menschlichen oder tierischen Körper

IPC: A 61 K, C 09 B

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 22. Oktober 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Weber

Weber

[Patentanmeldung]

5 **Herstellung eines Färbemittels zur Visualisierung
von Zellen im menschlichen oder tierischen Körper**

[Beschreibung]

Die Erfindung betrifft die Herstellung eines Färbemittels
10 zur Visualisierung von Zellen im menschlichen oder tieri-
schen Körper.

[Stand der Technik]

Hierzu ist es aus der WO 99/58160 bekannt, als Farbstoff
15 Trypan-Blau zu verwenden. Der bekannte Farbstoff wird in ei-
ner wässrigen Lösung zum Einfärben der Vorderkapsel für eine
Katarakt-Operation am Auge verwendet. Durch die Visualisie-
rung der Vorderkapsel erkennt der Chirurg den Umriss der
Kapsulorhexis, wodurch die Phakoemulsifikation erleichtert
20 wird.

Bei Trypan-Blau handelt es sich um eine zytotoxische Sub-
stanz, wie beispielsweise aus Solomon K.D. et al „Protective
effect of the anterior lens capsule during extracapsular ca-
25 taract extraction“ OPHTHALMOLOGY, vol. 96, no. 5, May 1989
(1989-05), pages 591-597 bekannt ist. Bei der Verwendung von
Trypan-Blau ist daher die vollständige Ausspülung insbeson-
dere des Augenbereiches, in welchem das Trypan-Blau als Fär-
bemittel zum Einsatz gekommen ist, unmittelbar nach der Ka-
30 taraktoperation erforderlich, um einen längeren Verbleib im
Körper bzw. im Auge zu vermeiden.

Ferner ist es bekannt (E. Kutchera, „Vitalfärbung der abgehobenen Netzhaut und ihre Defekte“, Albrecht v. Graefes Arch. klin. exp. Ophthal. 178, 72, 87 (1969)) zur Sichtbarmachung von die gesamte Netzhaut betreffenden Defekten in Fällen von Netzhautabhebung den Farbstoff Patent-Blau intravitreal zu injizieren. Für die intravitreale Injektion wurde eine 0,47%-ige Patent-Blau-Hyaluronsäure-Lösung verwendet. Die Visualisierung der Netzhautabhebung ist äußerst zeitaufwendig und ergibt sich erst einige Tage nach der Injektion.

10

[Aufgabe der Erfindung]

Aufgabe der Erfindung ist es, die Herstellung eines Färbemittels mit fehlender Zytotoxizität zu schaffen, welches zur Visualisierung von Membranen mit begrenzender oder trennender Funktion oder durch Erkrankung entstandener Membranen im menschlichen oder tierischen Körper geeignet ist.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die kennzeichnenden Merkmale des Patentanspruches 1 gelöst. Die Unteransprüche 20 beinhalten vorteilhafte Weiterbildungen der Erfindung.

Bei der Erfindung wird durch die Verwendung von Patentblau in einer physiologisch kompatiblen Lösung von insbesondere Natriumchlorid, die mit einem Puffer auf ein pH von 6,8 bis 25 7,8, insbesondere etwa 7,4 eingestellt sein kann, ein Färbemittel zur Visualisierung von Zellen, insbesondere von trennenden oder begrenzenden Membranen im menschlichen und tierischen Körper geschaffen. Bei Patentblau handelt es sich um einen Triphenylmethan-Farbstoff. Vorzugsweise kommt ein als 30 Lebensmittelfarbstoff (L-Blau 3 = E 131) zugelassenes Pa-

- tentblau V ($C_{54}H_{62}CaN_4O_{14}S_4$ MG. 1159,45) zum Einsatz. Als Puffer kann ein Phosphat-, Hydrogencarbonat- oder Citrat-Puffer, dessen pH-Wert mittels Natriumhydroxid eingestellt werden kann, verwendet werden. Die Konzentration von Patent-
5 blau V beträgt in wässriger Lösung vorzugsweise 0,6 bis 2,5 g/l, insbesondere etwa 1,2 g/l. Man erreicht eine spontane Einfärbung der gewünschten Bereiche im menschlichen oder tierischen Körper.
- 10 10 Das Färbemittel kann zum Anfärben der Linsenkapsel, insbesondere der Linsenvorderkapsel bei einer Katarakt-Operation verwendet werden. Die Anfärbung erfolgt vor der Kapsulorhexis und Phakoemulsifikation.
- 15 15 Für die Anfärbung wird das Kammerwasser durch eine korneale oder sklerale Tunnelinzision abgesaugt und die Vorderkammer anschließend mit einem Gas, insbesondere Luft gefüllt. Mit einer Kanüle werden ca. 0,3 ml Patentblau V in die Vorderkammer verabreicht. Es entsteht die Anfärbung der Linsenkapsel, welche durch den Pupillenrand der Iris begrenzt ist.
20 Nach einigen Sekunden wird zum Auswaschen des nicht benötigten Farbstoffes die Vorderkammer mit einer Natriumchlorid-Lösung ausgespült.
- 25 25 Anschließend wird für die Durchführung der Katarakt-Operation in herkömmlicher Weise eine viskoelastische Lösung in die Augenvorderkammer eingebracht. Aufgrund der blauen Verfärbung der Vorderkapsel tritt der Umriss der Kapsulorhexis klar hervor und lässt sich vom grauen Gewebe des Linsenkerns
30 klar unterscheiden.

Ferner kann das Färbemittel zum Anfärben der Membrana limitans interna oder beispielsweise infolge von PVR (proliferative Vitreoretinopathie) entstandenen Membranen, insbesondere epiretinalen Membranen an der Netzhaut oder an der Rückfläche der Glaskörperegrenzmembran, insbesondere bei Netzhaut- und Glaskörperchirurgie zum Einsatz kommen.

Beim Entfernen, beispielsweise einer epiretinalen Membran von der Netzhaut wird mit Hilfe einer über die Pars plana eingebenden Kanüle Patentblau V in ca. 0,3 ml der angegebenen Pufferlösung selektiv zur zu entfernenden Membran gebracht. Der Glaskörper kann vorher ganz oder teilweise durch eine Gasfüllung, wie sie in herkömmlicher Weise bei der Glaskörper- oder Netzhaut-, insbesondere Makulachirurgie zum Einsatz kommt, ersetzt sein. Beim Anfärben der epiretinalen Membran kann gegebenenfalls eine Anfärbung des benachbarten Retinagewebes mit schwächerem Einfärbungsgrad erfolgen. Beim Entfernen der Membran von dem darunter liegenden, nichteingefärbten Retinagewebe ergibt sich dann ein guter Kontrast.

Nach dem Anfärben wird überschüssige Färbemittellösung ausgespült und der freie Raum durch den angesprochenen gasförmigen Glaskörperersatz angefüllt. Durch die Einfärbung ist es möglich, mit einem nicht beleuchteten oder nur schwach beleuchteten Instrumenten beim Abtragen der Membran zu arbeiten. Hierdurch wird bei ausreichender Kontrastwahrnehmung die Lichttoxizität erheblich verringert. Insbesondere bei der Anwendung im Zusammenhang mit epiretinaler Membranen (Epiretinale Gliose, „macular pucker“, „surface wrinkling“) bildet der Einsatz der Färbemittellösung eine wertvolle Hilfe beim Aufsuchen und Entfernen der Membranen.

Wenn bei Makulaforamen mit zunehmender Lochgröße die Entfernung der Membrana limitans interna erforderlich ist, erweist sich die Einfärbung dieser Membran mit der Färbemittellösung als vorteilhaftes Hilfsmittel beim Aufsuchen und Entfernen
5 dieser Membran während der Glaskörperchirurgie.

Ferner ist es möglich, ein viskoelastisches Material, beispielsweise Hyaluronsäure, welches als Hilfsmittel bei der ophthalmologischen Chirurgie zum Einsatz kommt, mit der Patentblau V-Färbemittellösung einzufärben. Insbesondere lässt sich hierdurch bei der Katarakt-Operation eine Verbesserung des Kontrastes des viskoelastischen Hilfsmittels gegenüber dem intraokularen Gewebe, insbesondere der Augeniris und dem Fundusreflex erzielen.
10

15 Gegenüber dem herkömmlichen Trypan-Blau, welches teratogene oder mutagene Wirkung (Cahen RL: Evaluation of the teratogenicity of drugs, Clin Pharmacol. Ther, 1964, 5, 480-514 und Produktinformation BLURHEX™, Dr. Agarwal's Pharma Ltd.
20 Chennai (Indien)) hat, besitzt die erfindungsgemäße Lösung von Patentblau V keine Zytotoxizität.

Zum Nachweis fehlender Zytotoxität wurden Mauszellen L 929 und ARPE-19-Zellen mit dem erfindungsgemäßen Färbemittel mit unterschiedlichen Konzentrationen über 68 bis 72 Stunden im Brutschrank behandelt. Die Vitalität der Zellen und eine abgeleitete Zytotoxizität wird durch Bestimmung des Proteingehalts der behandelten Zellkulturen gegenüber unbehandelten Kontrollkulturen quantitativ bestimmt. Mit einem Standard-
25 30 Verfahren wird der Proteingehalt kolorimetrisch ermittelt.

Dabei zeigt sich, dass eine Zytotoxizität in signifikanter Höhe entsprechend einer Wachstumshemmung von mehr als 30% nicht vorhanden ist.

- 5 Die Erfindung erweist sich insbesondere von Vorteil bei der Durchführung von Katarakt-Operationen mit dichten Katarakten und/oder schwer pigmentierten Fundi, bei denen der Fundusreflex nur schwach ausgebildet ist oder fehlt. Mit Hilfe des Einfärbmittels erreicht man einen guten Kontrast zwischen
10 der Vorderkapsel und dem unterliegenden Gewebe.

[Beispiele]

Im folgenden werden Ausführungsbeispiele des Färbemittels in verschiedenen Pufferlösungen angegeben.

15

Beispiel 1

Patentblau V mit einer Konzentration von 1,2 g/l in einer Phosphat-Puffer-Lösung.

20 200 ml Lösung enthalten:

0,240 g Patentblau V

0,380 g Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$)

0,060 g Natriumdihydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$)

1,640 g Natriumchlorid (NaCl)

25 Natriumhydroxid zur pH-Einstellung.

Beispiel 2

Patentblau V mit einer Konzentration von 1,2 g/l in einer Hydrogencarbonat-Puffer-Lösung.

30

200 ml Lösung enthalten:

0,240 g Patentblau V

0,420 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)

1,640 g Natriumchlorid (NaCl)

5 Natriumhydroxid zur pH-Einstellung

Beispiel 3

Patentblau V mit einer Konzentration von 1,2 g/l in einer Citrat-Puffer-Lösung.

10

200 ml Lösung enthalten:

0,240 g Patentblau V

0,216 g Trinatriumcitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$)

1,640 g Natriumchlorid (NaCl)

15 Natriumhydroxid zur pH-Einstellung

Vorzugsweise wird bei den Pufferlösungen der pH-Wert durch Natriumhydroxid eingestellt. Es ist jedoch auch möglich, die Lösung selbst auf den gewünschten pH-Wert (neutral, schwach sauer, schwach alkalisch) innerhalb des bevorzugten Bereiches von 6,8 bis 7,8 einzustellen. Die Einstellung der Konzentration von Patentblau auf vorzugsweise 0,6 bis 2,5 g/l, insbesondere etwa 1,2 g/l erfolgt durch eine entsprechende Menge an Patentblau V.

25

[Patentansprüche]

1. Verwendung von Patentblau V in einem neutralen oder schwach sauren oder schwach alkalischen Puffer zur Herstellung eines Färbemittels für die Visualisierung von Zellen im menschlichen oder tierischen Körper.
- 5 2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Färbemittel zur Visualisierung von begrenzenden oder trennenden Membranen, insbesondere im Auge herstellt wird.
- 10 3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Färbemittel zur Visualisierung von aus einem Körperorgan, insbesondere dem Auge zu entfernenden Membranen hergestellt wird.
- 15 4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Färbemittel zur Visualisierung der Linsenkapsel des Auges hergestellt wird.
- 5 5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Färbemittel zur Visualisierung der Linsenvorderkapsel bei einer Katarakt-Operation am Auge hergestellt wird.
- 20 6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Färbemittel zur Visualisierung von durch Erkrankung in oder an einem Körperorgan, insbesondere der Netzhaut des Auges entstandenen Membranen hergestellt wird.
- 25

7. Verwendung nach Anspruch 6,
wobei das Färbemittel zur Visualisierung epiretinaler
Membranen hergestellt wird.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das
5 Färbemittel zum Einfärben einer insbesondere in der
ophthalmologischen Chirurgie eingesetzten viskoelasti-
schen Lösung hergestellt wird.
9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
10 wobei das Patentblau V im einem Puffer mit einem pH-Wert
von 6,8 bis 7,8 gelöst wird.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9,
wobei ein Phosphat-, Hydrogencarbonat- oder Citrat-
Puffer verwendet wird.
11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
15 wobei die Konzentration von Patentblau in der Pufferlö-
sung 0,3 bis 2,5 g/l, insbesondere etwa 1,2 g/l beträgt.

[Zusammenfassung]

Verwendung von Patentblau V zur Herstellung eines Färbemittels für die nicht zytotoxische Visualisierung von Zellen,
5 insbesondere begrenzenden oder trennenden Membranen im menschlichen oder tierischen Körper, insbesondere im Auge.